



TITLE:

# Enzymatic and applied studies on gut microbial metabolisms of bioactivecompounds( Digest\_要約 )

AUTHOR(S):

Sakurama, Haruko

---

CITATION:

Sakurama, Haruko. Enzymatic and applied studies on gut microbial metabolisms of bioactivecompounds. 京都大学, 2014, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2014-03-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r12822>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は  
2014/12/01に公開

Enzymatic and applied studies on gut microbial metabolisms of  
bioactive compounds

(腸内細菌による生理活性物質代謝の酵素学的解析と応用)

櫻間 晴子

2014 年

## 【諸言】

多様な微生物種により構成される腸内細菌叢は、宿主と密接な共生関係を築いている。この腸内細菌叢は、食餌や薬物成分などに由来する生理活性物質の影響を受け推移する一方で、その代謝産物を介して宿主の生理機能に影響を及ぼす。よって、腸内細菌叢における生理活性物質の代謝ならびに代謝産物の解析は、腸内における複雑な共生関係を支える分子基盤の解明に役立つとともに、科学的根拠に基づいた機能性分子の開発などの応用につながると考えられる。そこで、本論文では、酵素学的手法を基盤に、様々な生理活性物質 (Fig.1) に関する腸内細菌代謝の解析を行った。さらにそれらの代謝に関わる腸内細菌または酵素を機能性物質の生産へと応用した。

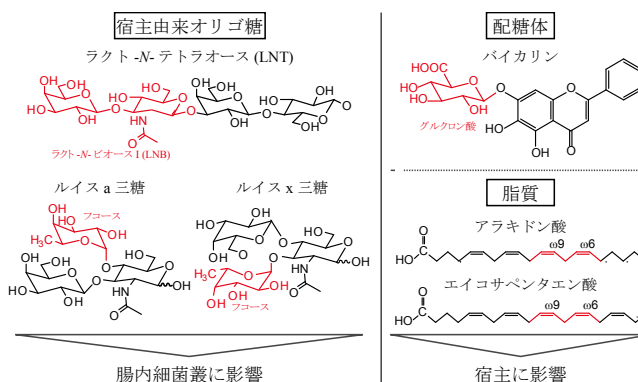


Fig. 1. 本研究で着目した生理活性物質

## 第1章. *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 由来ラクト-N-ビオシダーゼ

人乳に含まれる難消化性オリゴ糖 (ヒトミルクオリゴ糖、HMO) は 130 種類以上のオリゴ糖の混合物であり、乳児期におけるビフィズス菌優勢な腸内細菌叢の形成に寄与すると考えられてきた。ラクト-N-テトラオース (LNT) (Fig. 1) は HMO に最も多く含まれる主要コア四糖構造であり、他の哺乳類にはほとんど存在しない。近年、腸内細菌の中でも乳児の糞便から頻繁に単離されるビフィズス菌にのみ共通して LNT 資化能が検出され、その資化経路は菌種間で異なり、これらのビフィズス菌が多様な方法でヒトとの共生関係を築いたことが示唆されてきている。これらビフィズス菌のうち、*Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*) ならびに *B. longum* subsp. *longum* (*B. longum*) は、LNT をラクト-N-ビオース I (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc, LNB) とラクトースに分解するラクト-N-ビオシダーゼ (LNBase) 活性を有することが見いだされ、両菌は HMO を分解して LNB の形で細胞内に取り込む経路が予想された。そのうち、*B. bifidum* 由来の LNBase (*BbLnbB*) は既に同定されているが、*B. longum* のゲノム上には *BbLnbB* の類似配列が存在しなかった。そこで、*B. longum* 由来 LNBase を単離し、その機能解析を行った。

大腸菌を用いた発現クローニングおよび *B. longum* を用いた遺伝子破壊と相補実験を行い、LNBase 活性発現には機能が全く未同定の 2 つの ORF (LnbX ならびに LnbY) が必須であることを示した (Fig. 2)。次に、両遺伝子を共発現させた大腸菌の無細胞抽出液から活性を指標に LNBase を単離し、LnbX が酵素本体であることを示した。さらに、グアニジンで変性させた LnbX を用いた *in vitro* の refolding 実験を行い、LnbY は LnbX の特異的なシャペロンタンパク質であることを示した。また、LnbX はアノマー保持型

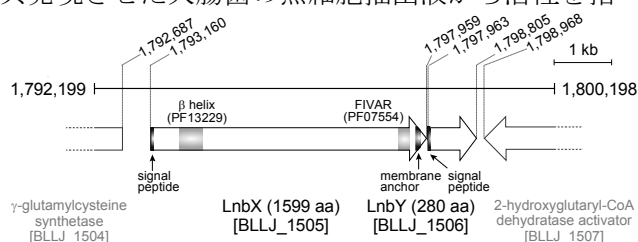


Fig. 2. ラクト-N-ビオシダーゼ (*lbnXY*) の遺伝子構造

酵素であり、その LNT に対する触媒活性は *BbLnbB* よりも高いことを示した。*B. longum* は HMO の中では主に LNT を利用するため、その高い活性は生存に有利に働くと考えられた。さらに、*LnbX* の基質特異性は *BbLnbB* よりも広く、フコシル基やシアル酸残基で修飾された LNT にも作用した。加えて、*LnbX* は人工基質から GalNAc $\beta$ 1-3GlcNAc を遊離できたことから、 $\alpha$ -ジストログリカンの O-マンノシル型糖鎖などの構造解析において有用なツールとして役立つ可能性も示された。

## 第 2 章. *Bacteroides thetaiotaomicron* 由来の $\alpha$ -L-フコシダーゼ

$\alpha$ -L-フコシル基は HMO、ルイス式血液型抗原決定基 (Fig. 1) など宿主由来のオリゴ糖および糖鎖の非還元末端に頻繁に存在する。 $\alpha$ -L-フコシダーゼはこれら宿主由来のオリゴ糖および糖鎖から  $\alpha$ -L-フコシル基を切断することができるため、腸内細菌がこれら宿主由来の糖質を利用するのに必須の酵素であると考えられる。糖質加水分解酵素ファミリー 29 (GH29) に属する  $\alpha$ -L-フコシダーゼは広い基質特異性を有することで知られているが、近年、著者らはその基質特異性および系統樹解析を基にして、さらに 2 つのサブファミリー (GH29-A/B) に分類できる可能性を見いだした。すなわち、GH29-A の酵素 (EC 3.2.1.51) は *p*-ニトロフェニル- $\alpha$ -L-フコピラノシド (*p*NP-Fuc) を含む種々のフコシル結合に作用するのに対し、GH29-B の酵素 (EC 3.2.1.111) は 1,3/4- $\alpha$ -L-フコシル基を特異的に切断する厳密な基質特異性を有する。腸内の優勢菌種である *Bacteroides thetaiotaomicron* は、立体構造が既に Protein Data Bank に登録されているものの基質特異性が明らかとなっていない 2 つの  $\alpha$ -L-フコシダーゼを有している (BT\_2970 は GH29-A に、BT\_2192 は GH29-B に分類される)。そこで、この 2 つの  $\alpha$ -L-フコシダーゼの酵素学的諸性質を決定し、サブファミリーを規定する候補残基について考察した。

このサブファミリーの分類から予想されたとおり、BT\_2970 は *p*NP-Fuc に、BT\_2192 は分岐した Gal を有するフコシルオリゴ糖 (ルイス a/x 三糖など) によく作用した。両酵素の構造比較からそれらの基質特異性を規定する候補残基を推定できたことから、このサブファミリーの分類方法の妥当性が示された。興味深いことに、GH29-B の酵素は BT\_2192 の他に、HMO 資化能の高い *B. bifidum* (*BbAfcB*) や *B. longum* subsp. *infantis* (*BiAfcB*) に存在しており、GH29-B は宿主由来の糖質を利用するために進化した可能性が考えられた。

## 第 3 章. 1,3-1,4- $\alpha$ -L-フコシダーゼのフコシターゼ化

ルイス a/x 抗原決定基 (Fig. 1) は、多くの組織や臓器に存在し発生や癌化など重要な生命現象に深く関わっている。よって、研究ツールのみならず医薬品等への利用が考えられ、その効率的な合成方法の開発が望まれていた。*BbAfcB* は前章で述べた GH29-B に属するため、オリゴ糖の精密合成への利用が期待された。そこで、*BbAfcB* を機能改変し、ルイス a/x 三糖などのフコシルオリゴ糖の合成に応用した。

*BbAfcB* の求核残基と推定された D703 置換体を作製したところ、加水分解活性が野生型酵素に比べて激減し、D703 が求核残基であることが示唆された。そこで、供与体にフッ化フ

コースを、受容体にLNBあるいはN-アセチルラクトサミンを用いて反応を行った結果、D703Sによってルイスa/x 三糖が合成されることを見いだした。本反応は、受容体特異性および位置特異性が極めて高く、上記の二糖とラクトース構造を有する糖の還元末端 (GlcNAc/Glc) の3位もしくは4位にフコシル基を導入する以外、他の二糖構造を有する糖や単糖へのフコシル基導入は全く観察されなかった。また、合成効率は供与体に対して約50%であった。以上の結果から、D703Sがルイスa/x 三糖の合成に極めて有用なツールとなることが示唆された。さらに、*BbAfcB*と同様にGH29-Bに属する*BiAfcB*の複合体のX線結晶構造解析を行った結果、リガンド結合に伴い活性中心近傍のループが大きく構造変化し、触媒残基が適切な位置に配置されること (induced-fit) が明らかとなった。また、*BiAfcB*はフコースが結合しているGlcNAc残基よりも、分岐したGal残基と強く相互作用していた。よって、このGal結合部位の存在およびinduced-fitが*BiAfcB*ならびに*BbAfcB* D703Sのユニークな基質特異性を規定する分子機構であることが明らかになった。

#### **第4章. *Lactobacillus brevis* 由来 $\beta$ -グルクロニダーゼ**

フラボノイドなどの植物の二次代謝産物には生薬成分が多数存在し、それらの多くは配糖体として蓄積されている。バイカリン (baicalein 7-O- $\beta$ -D-glucuronide) (Fig. 1) は特定のシソ科植物で生産されるフラボノイドグルクロン酸配糖体であり、生薬成分としてよく知られている。その薬効は腸内細菌の  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) による加水分解を受け発揮されるため、腸内細菌叢に依存する。近年、プロバイオティクスである乳酸菌由来の GUS が見いだされ、腸内細菌叢に依存しないバイカリンの薬効発現のための利用が期待されている。一方で、腸内細菌の GUS は体内の薬物代謝に密接に関係しており、グルクロン酸修飾により一度不活化された脂溶性生理活性物質を腸内でもう一度活性化させ、体内に蓄積させてしまう腸肝循環の原因を担う酵素として知られている。よって、GUS 活性を有するプロバイオティクスをそのままバイカリンの薬効発現のために利用する際には、腸肝循環も考慮する必要があると考えられる。そこで、*Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* 由来のバイカリン変換酵素を同定し、腸内での薬物代謝酵素としての機能を推定した。

本菌の無細胞抽出液からバイカリン変換活性を指標に本酵素を単離精製した。精製酵素の N 末端アミノ酸配列の分析結果を基に、本酵素の遺伝子をクローニングした。その結果、本酵素 (*LcGUS30*) は分子量 60 kDa の GH30 に属する GUS であった。既存の GUS は、GH1、2、79 にしか存在しておらず、*LcGUS30* ともほとんど相同性を示さないことから、*LcGUS30* は新規性の高い GUS であることが示された。また、GH30-サブファミリー-3 の分子系統樹解析から、*LcGUS30* を含む相同配列はこのサブファミリーで新しいグループを形成することを提案した。さらに、組換え酵素の機能解析から、*LcGUS30* は糖に対しては厳密だがアグリコンに対しては広い基質特異性を有する GUS であることが示された。加えて、漢方薬の配糖体成分として存在するワゴノシドに対しても変換活性を示したことから、*LcGUS30* がバイカリンならびにワゴノシド変換酵素として有効であることを示した。一方、体内ステロイドホルモンであるエストロン 3- $\beta$ -D-グルクロニドなどヒト由来基質に対する親和性が低く、腸肝循環に影響を及ぼす代表的な腸内細菌である大腸菌由来の GUS とは異なる基

質特異性を有することが示された。よって、*L. brevis* subsp. *coagulans* は腸肝循環に影響を与えず、経口摂取されたフラボノイドグルクロン酸配糖体を効率的に変換する有用な菌である可能性が考えられた。

## 第5章. 嫌気性細菌による炭素数 20 の高度不飽和脂肪酸の飽和化反応

腸内細菌に代表される嫌気性細菌による不飽和脂肪酸 (PUFA) の飽和化反応は、遊離型 PUFA の解毒代謝として知られている。腸内細菌による不飽和脂肪酸代謝反応は機能性脂質の開発ならびに宿主の脂肪酸組成制御という観点から興味を持たれる。しかし、これらの研究は炭素数 18 の PUFA に集中しており、炭素数 20 の PUFA の代謝に関してはほとんどなされていない。そこで、炭素数 20 の不飽和脂肪酸であるアラキドン酸 (AA)、エイコサペンタエン酸 (EPA) (Fig. 1) の飽和化反応を行う腸内細菌を選抜し、その代謝産物を同定した。

### **【要約】**

1. *B. longum* の LNBBase の発現には *lnbX* と *lnbY* の 2 つの遺伝子が必要であり、LnbX は酵素本体、LnbY はその特異的シャペロンであることを明らかにした。LnbX は *BbLnbB* よりも LNT に対する高い触媒活性と広い基質特異性を有することを示した。
2. GH29 に属する  $\alpha$ -L-フコシダーゼの GH29-A/B のサブファミリーの分類方法の妥当性を示し、この分類を規定する候補残基を同定した。
3. *BbAfcB* を機能改変し、ルイス a/x 三糖などのフコシルオリゴ糖の精密酵素合成に成功した。さらに、*BiAfcB* の複合体の X 線結晶構造解析により、その分子基盤を解明した。
4. バイカリン変換酵素として、*L. brevis* subsp. *coagulans* 由来の GH30 に属する新規の GUS を同定した。さらに、*LcGUS30* は大腸菌由来の GUS とは異なるアグリコン特異性を有することを明らかにした。
5. 炭素数 20 の PUFA 飽和化反応を行う腸内細菌を選抜し、本菌の代謝産物を同定した。